

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.

29000

X

31671 E/16 SASAKI T	A96804 29.08.80-JP-119313 (10.03.82) A61k-35/24 A61k-37/02	SASA/ 29.08.80 *J5 7042-632	A(10-E, 12-V1) B(4-B4A, 4-C3, 12-A7, 12-D2) 4 autoimmune diseases, particularly systemic lupus erythematoses. dsDNA-D-GL may be administered orally, subcutaneously or intraperitoneally at a single or in divided doses as an aq. soln. of 10-50 mg/ml once or several times a week.
Adduct of double-stranded DNA with D-glutamic acid-D-lysine copolymer is new. The adduct (dsDNA-D-GL) has the following physico-chemical properties: (i) appearance: amorphous white powder; (ii) mpt. 263-4°C (dec); (iii) solubility: soluble in H ₂ O, 0.01M phosphate buffer, aq. NaCl; insoluble in MeOH, EtOH, BuOH, Me ₂ CO, EtOAc, CHCl ₃ ; (iv) specific rotation: $\alpha_{D}^{25} + 36.67$; (v) acidity: pH 5.8-6.0 (1.2% aq. soln.); (vi) colour reaction: positive to α-naphthol, diphenylamine, cysteine H ₂ SO ₄ , indole, Feulgen's, biuret, Cl-KI, and Cu-Folin reactions; negative to Lieberman's, Zimmerman, and FeCl ₃ reactions; (vii) elemental analysis: C 42%, H 6%, N 13%; and (viii) characteristic IR and UV spectra.	PREPARATION	DNA, commercially available or extracted from animal tissues, is treated ultrasonically in order to make the size uniform, and then with nuclease to give dsDNA. dsDNA is oxidized with NaIO ₄ in H ₂ O or a buffer soln. under cooling or at room temp. for 1-2 hr. The lysine copolymer (D-GL) in the same solvent as above is added (excess NaIO ₄ is removed by addition of ethylene glycol) at pH 8-10 under cooling or at room temp. for 1-12 hr. The product is then reduced with NaBH ₄ to give the adduct, which may be purified by gel filtration or chromatography using ion exchange resins.(8ppW52)	179 J57042632

SP

(1)

⑯ 日本国特許庁 (JP)

⑰ 特許出願公開

⑯ 公開特許公報 (A)

昭57-42632

⑮ Int. Cl.³
A 61 K 37/02
35/24

識別記号

厅内整理番号
7138-4C
7138-4C

⑯ 公開 昭和57年(1982)3月10日
発明の数 3
審査請求 未請求

(全 8 頁)

⑯ 二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物およびその製造法ならびにこれを含む薬剤

塩釜市桜ヶ丘8-2

⑰ 出願人 佐々木毅

塩釜市桜ヶ丘8-2

⑰ 出願人 石田名香雄

仙台市角五郎一丁目5-40

⑯ 特願 昭55-119313

⑰ 代理人 弁理士 有賀三幸 外1名

⑯ 出願 昭55(1980)8月29日

⑯ 発明者 佐々木毅

明細書

水溶性)

1. 発明の名称

二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物およびその製造法ならびにこれを含む薬剤

(6) 呈色反応 ナ-ナフトール反応、ジフェニルアミン反応、システィン試験反応、インドール反応、フォイダジン反応、ピクレット反応、C8-KI反応、鋼-フォリリン反応は陽性；リーベルマン反応、ジンメルマン反応、塩化銀2液反応は陰性

2. 特許請求の範囲

I. 次の物性

(1) 物質の色 雜形白色粉末

(2) 融解点 263~264°C(分解)

(3) 溶解性 水、0.01Mリン酸緩衝液、生理食塩水に可溶；メタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、酢酸エチル、クロロホルムに不溶

(4) 比旋光度 $[\alpha]_D^{25} = +36.67$

(5) 酸基性・碱性の区别 pH 5.8~6.0 (1.2%)

7) 可外吸収スペクトル 第1図

8) 可外吸収スペクトル 第2図

(9) 元素分析組成 C:約4.2%、H:約6%、N:約1.3%
を有する二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物、

2. 二本鎖DNAの塩化銀-D-グルタミン酸-

D-リジンコポリマーを反応せしめ、次いでこれを還元することを特徴とする二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物の製造法。

3. 次の特徴

- (1) 物質の色 無定形白色粉末
- (2) 融解点 263~264°C(分解)
- (3) 溶解性 水、0.01Mリシン酸鈉液、生理食塩水に可溶；メタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、酢酸エチル、クロロホルムに不溶
- (4) 比旋光度 $[\alpha]_D^{25} = +36.67$
- (5) 培養性・区分の区别 pH 5.8~6.0(1.2% 水溶液)
- (6) 呈色反応 α-ナフトール反応、ジフェニン酸反応

ルアミン反応、システィン残基反応、インドール反応、フォイダゲン反応、ピウレット反応、CB-KI反応、四-フオリン反応は陰性；リーベルマン反応、ジシメルマン反応、塩化第2鉻反応は陽性。

- ⑦ 赤外吸収スペクトル 第1図
- ⑧ 赤外吸収スペクトル 第2図
- ⑨ 元素分析組成 C:約42%、H:約6%、N:約13%を有する二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物を有効成分として含有する薬剤。

3. 発明の詳細を説明

本発明は所見を二本鎖DNAとD-グルタミ

ン酸-D-リジンコポリマーとの結合物およびその製造法ならびにこれを有効成分として含む自己免疫性疾患治療剤に関する。

自己免疫性疾患は、自分自身で自己抗体（自分自身の組合抗原に対して抗体様の活性をもつもの）を産生する疾患であり、自分自身の組合抗原に対して抗体をもつてゐる場合は抗体を産生するのに、自分自身の組合、出胞を自ら破壊するという極めて不合理的な疾患である、そして、自己免疫性疾患には、全身性エリテマトーデス（以下SLEと略記する）、過敏性皮膚炎、皮膚病、リウマチ関節炎、自己免疫性溶血性貧血等がある。

SLEでは、自己抗体としてデオキシリボ核酸

（DNA）抗体、赤血球抗体、リンパ球抗体及びその他の組合抗体が血液中に出現し、このリンパ球抗体の出現はリンパ球の減少、赤血球抗体の出現は溶血性貧血等の原因を惹起する。この中で最も問題とされるのはDNA抗体であり、組合の複数によつて癌細胞から出てきたDNAが血液中でDNA抗体と結合してDNA-DNA抗体免疫複合体を形成し、血管炎、腎炎の原因となり、皮膚炎、筋肉炎、骨髄球体腫瘍等を誘発する。

従来、SLEの治療には、ステロイド薬又はこれとエンドキサン、サイクロホスファマイド等の免疫抑制剤との併用が使用されていた。

しかし、これらの薬剤を服用すると、免疫不全、内化酸过多、血压亢進、骨盤症、耳

急性大脳脊髄炎、急性心臓皮質不全、白血球減少症の副作用を惹起する欠点があつた。

斯る実状において、本発明者は自己免疫性疾患の治療に臨時投与を行い、SLEにおいて、DNA抗体の産生を特異的に抑制することができれば、理想的な治療がなされるのではないかと考え、我々研究を行つた結果、二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物が斯る作用を有することを見出し、本発明を完成した。

従つて、本発明の目的は、前述の二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物を提供せんとするものである。

本発明の他の目的は、当該結合物を製造する方法を提供せんとするものである。

本発明の更に他の目的は、当該結合物を有効成分として含む自己免疫性疾患治療剤を提供せんとするものである。

本発明の二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物は、例えば次のようにして製造される。

まず、市販されているDNAあるいは動物から抽出したDNAを超音波等によつて処理してその大きさを揃えた後スクレアーゼ処理して二本鎖DNA（以下dsDNAと略記する）を得る。動物細胞DNAは粗等異抗原性が少ないので、本発明では、如何なる細胞の動物のDNAも使用できる。このdsDNAは過ヨウ基酸ナトリウム等の酸化剤で処理してその酸化物とする。反応は、水又は溶媒中、冷却下ないし

室温で1～12時間行うのが好ましい。

次いで、dsDNAの酸化物にD-グルタミン酸-D-リジンコポリマー（以下D-GLと略記する）を反応させる。D-GLは一般に市販されているものを使用でき、これは通常dsDNAの10～30質量倍を使用するのが好ましい。反応は、上記と同じ溶媒中、実験には、上記反応液にエナレンクリコール等を加えて余分の過ヨウ基酸ナトリウムを除去したものにD-GLを加えて行うのが好ましい。反応系はpH 8～10に保持し、反応は冷却下ないし室温で1～12時間行われる。

更に、斯くして得られる反応物を水基化ホウ酸ナトリウム等で差元すればdsDNAとD-GLの結合物が得られる。このものは、ゲル

通過、イオン交換クロマトグラフィーにてして未反応のdsDNA、D-GLを除去し、用意することができる。

このようにして得られた本発明の二本鎖DNAとD-グルタミン酸-D-リジンコポリマーとの結合物（以下、dsDNA-D-GLと略記する）は次のような物性を有する。

- (1) 外観の色 純定形白色粉末
- (2) 融解点 263～264℃(分解)
- (3) 溶解性 水、0.01Mリン酸緩衝液、生理塩水に可溶；メタノール、エタノール、ブタノール、アセトン、酢酸エチル、クロロホルムに不溶
- (4) 比旋光度 $[\alpha]_D^{25} = +36.67$
- (5) 酸性・堿性の区別 pH 5.8～6.0(1.2%水)

特開昭57- 42632 (4)

dsDNA 抗体値及び dsDNA 抗体産生細胞数が著しく減少するので、自己免疫性疾患の治療及び予防をすることができる。dsDNA - D - GLは、例えば 10~50 μg/ml の水溶液とし、週に 1 回ないしは数回、陰口、皮下注射、腹腔内注射等によつて投与するのが好ましく、急性病状悪化時には更に投与量を増すことができる。

次に実施例を挙げて説明する。

実験例 1

(1) dsDNA の調製

市販仔牛胸腺 DNA 200 mg をリン酸緩衝液で溶解し、微細振盪 (Tomy model 150 P) を用いて、150 W で氷冷下、1 分毎に停止

溶液)
(6) 呈色反応 ハーナフトール反応、ジフェニルアミン反応、システイン銀鏡反応、インドール反応、フォイエルゲン反応、ピクレット反応、C6-KI 反応、ホーフォリン反応は陰性；リーベルマン反応、ジメルマン反応、塩化第 2 鉄反応は陽性

(7) 赤外線吸収スペクトル 第 1 図

(8) 赤外線吸収スペクトル 第 2 図

(9) 元素分析組成 C: 約 42%、H: 約 6%、N: 約 13%

本培養の dsDNA - D - GL は、前述の実験例に示すごとく、これを動物に投与すると、特異的 IC dsDNA に対する免疫反応を認めたし、

しながら 10 分間超音波処理を行つた。これに IC、0.1 mM 塩化亜鉛含有 0.2 M 酶取吸液液 (pH 5.0) 5 ml、ヌクレアーゼ S (10⁵ 単位/ml) 2.5 ml、蒸留水 17.5 ml を加えて、一本鎖 DNA を分解した後、4°C で 24 時間 PBS に透析した。これをセファロース 6B カラムでゲルが通し、各各出分画の OD₂₆₀ を測定すると、void volume の位置に单一なピークが観察される。この部分をを集め、高純度として 170 mg の dsDNA を得た。

(10) dsDNA - D - GL の製造

(1) で得た dsDNA 10 mg を 1 ml / ml となるよう蒸留水に溶解し、氷冷下これに 0.2 M 過ヨウ酸鉄ナトリウム水溶液 1.0 ml をゆっくりと加える。室温で攪拌しながら 1 時間反応さ

せ、反応液にエチレングリコールを 0.006M になるように加え、室温で 10 分間反応させて、過剰の過ヨウ酸鉄ナトリウムを除去する。この溶液に、市販の D - GL (分子量 49,000、D - グルタミン酸 : D - リシン = 6.0 : 4.0) 200 mg を 1% 塩酸水溶カリウム水溶液 20 ml にとかしたものと、dsDNA : D - GL が 1 : 2.0 (質量) にたるよう加え、室温で 1 時間攪拌して反応させる。この間 5% 反応カリウムを加えて、反応液の pH を 9.5 に保持する。この反応液に水溶化ホウ酸ナトリウムを 1 mg / ml になるように加え、4°C で 16 時間放置の後、透析チューブに入れて、0.1 M 過ヨウ酸鉄ナトリウム水溶液に対して 4°C で 48 時間透析した。これをセファロース 6B カラムで

ゲル通過し、各出各分画の dsDNA 吸収を OD₂₆₀ にて、D - GL 濃度を Lowry - Folin 法で測定した。OD₂₆₀ の吸収ピークは void volume の位置に单一のピークを示した。D - GL のピークは 2 本現われ、その 1 本は void volume の位置で、OD₂₆₀ のピークと完全に一致し、他の 1 本はこれよりかくれて出現した。OD₂₆₀ のピークに従つて分画を挿め、収縮乾燥して 4.6 ml の粉末を得た。

斯くして得られた dsDNA - D - GL の dsDNA と D - GL の適合比は 1 対 4 であつた。またこのものの超速心分離の結果は第 3 図のとおりであり、单一であつた。

実験例 2

dsDNA - D - GL 投与による dsDNA IC 対す

いて測定した。

その結果は第 4 図のとおりであり、dsDNA 抗体価は 14 匹中 11 匹で上昇せずまた、ssDNA 抗体価は 14 匹中 6 匹は上昇しなかつた。また、ssDNA 抗体価上昇抑制効果は dsDNA 抗体価上昇抑制より弱く、dsDNA - D - GL は dsDNA 抗体価の上昇を特異的に抑制することがわかる。

(ii) dsDNA - D - GL 投与後の脾細胞中の dsDNA 抗体産生細胞数の測定：

dsDNA - D - GL を生理食塩水に浴解し、1.00 mg / ml 濃度を調製する。4 ヶ月令の NZB / W F₁ 雄マウスに、先に調製した dsDNA - D - GL 濃度 1 mg を毎回 1 回づつ 12 ヶ月令まで、腹腔に注射した。対照には同様にして生理食塩水を投与した。12 ヶ月令になつた時、

る免疫反応の誘導：

(i) dsDNA - D - GL 投与後の血中 dsDNA 抗体

の測定：

dsDNA - D - GL を生理食塩水に浴解し、1.00 mg / ml 濃度を調製する。4 ヶ月令の NZB / W F₁ 雄マウスに、先に調製した dsDNA - D - GL 濃度 1 mg を毎回 1 回づつ 12 ヶ月令まで、腹腔に注射した。対照には同様にして生理食塩水を投与した。12 ヶ月令になつた時、採血し、血清中の dsDNA 抗体の力価と一本 dsDNA (以下、ss-DNA と略記する) 抗体の力価を受身赤血球凝集反応法 (dsDNA 又は ssDNA を吸着させた赤血球の浮遊液に dsDNA 抗体又は ssDNA 抗体を含んだ血清を加えると抗体抗体反応をおこし赤血球が凝集する反応)

生理食塩水を投与した。12 ヶ月令になつた時、マウスを殺し、脾臍を取り出し、ステンレス皿の上におき、上から加圧し、脾臍細胞を皿の網目を通して漏れさせることにより、脾臍細胞をバラバラにする。この細胞に、dsDNA を吸着させた羊赤血球と、モルモットの母体を加えた (7 s 抗体測定の時には、さらに IgG 抗血清を加えた) 後、Cunningham - Staenberg chamber に封入する。この chamber を 3.7 °C で 1 時間インキュベートすると抗体を産生している細胞のまわりの羊赤血球が凝集し、ブラークを形成するので、この数を数えて dsDNA 抗体産生細胞数を求めた。

その結果は第 1 表のとおりであり、対照群では、190 dsDNA 抗体産生細胞数は 6135

4/母白、7d dsDNA 抗体産生細胞数は
2928口/母白であつたが、dsDNA-D-
GL 投与群では、それぞれ 742 口/母白、
400 口/母白で dsDNA-D-GL 投与群で
は、dsDNAに対する免疫反応が誘導された。

以下余白

図 1 級	dsDNA-D-GL 口 与 7d dsDNA 抗体産生 細胞数/母白		dsDNA-D-GL 口 与 19d dsDNA 抗体産生 細胞数/母白
	对照	dsDNA-D-GL 投与群	
1	6700	0	0
2	3000	ND	0
3	12000	4800	0
4	4600	900	0
5	5700	0	0
6	3500	2800	ND
7	5200	1600	ND
8	5000	ND	2600
9	8500	ND	1600
10	8000	ND	0
11	9400	10400	2400
12	2200	ND	3600
13	5500	ND	100
14	6600	ND	ND
計	61357 ± 2660	29286 ± 3705	742 ± 1250
			400 ± 1131

実験例 3

既に dsDNA 抗体を産生している NZB/W F₁ マウスに対する dsDNA-D-GL の治療効果

一図 15 匹の 7ヶ月令の雌 NZB/W F₁ マウス（既に dsDNA 抗体を産生しているもの）に、4. 図面の図示を説明
dsDNA-D-GL 100 μg / 口 生理食塩水 1
ml を、毎 1 回 12ヶ月令まで皮下に投与し、
12ヶ月令での生存数を観察した。対照群には、同マウス 21 匹を使用し、生理食塩水を
投与した。

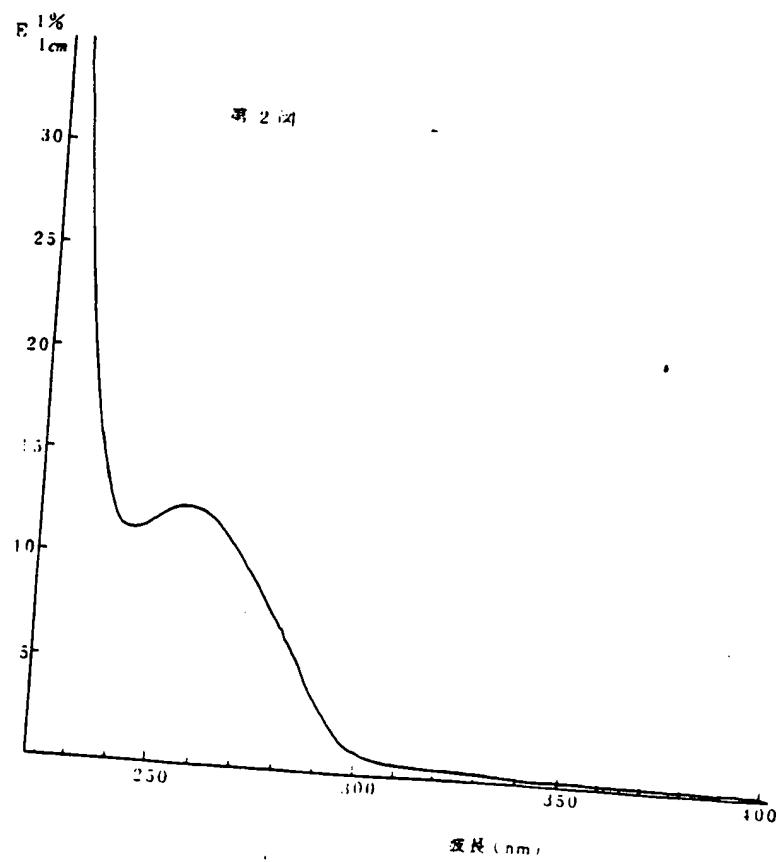
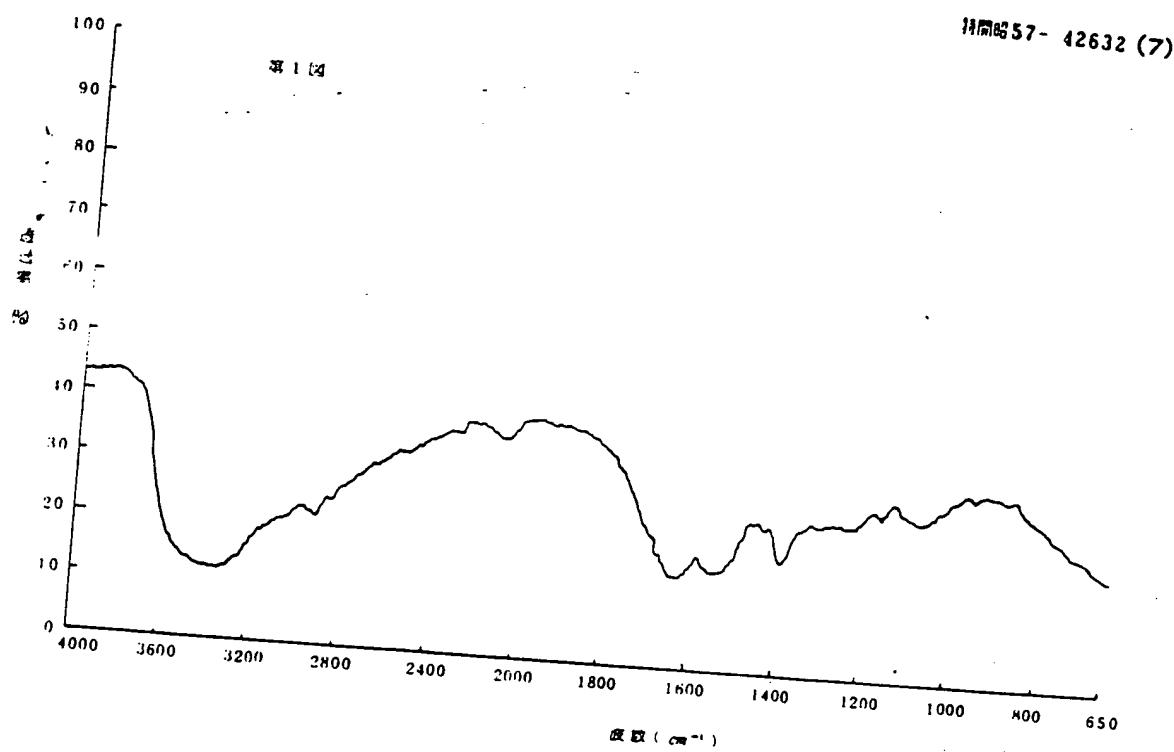
その結果は別表のとおりであり、dsDNA-D-GL の投与により自己免疫性疾患を治す
ことができることがわかる。

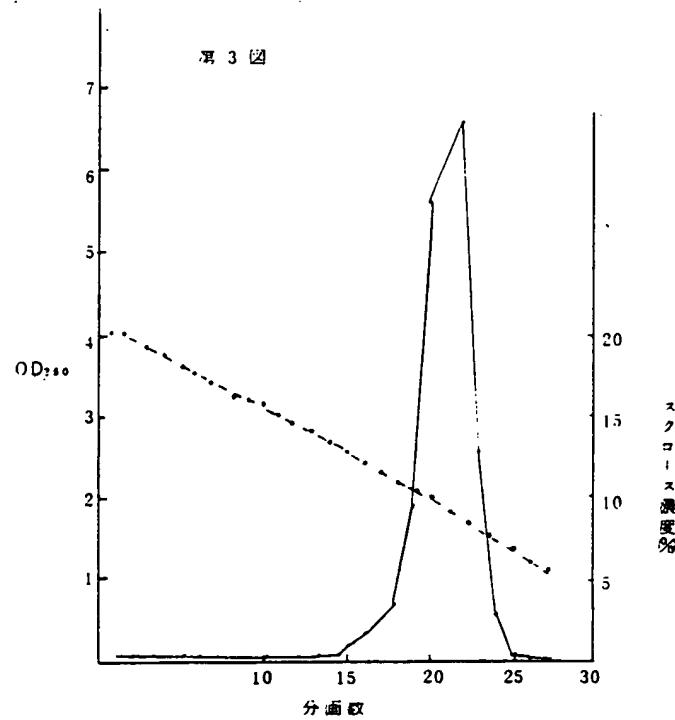
実験例 4

生存数/使用数(四) 生存率 (%)
对照 14/21 66.7
dsDNA-D-GL 投与群 15/15 100

図 1 図は本発明のニホン DNA と D-グリコシル基 - D-リジンコポリマーとの結合物の
赤外線吸収スペクトル、図 2 図は同結合物の
紫外線吸収スペクトル、図 3 図は同結合物の
 SDS 分析の結果、図 4 図は同結合物の投与
による一本の DNA 抗体及び二本の DNA 抗体
の抗体滴定上昇時間の変化を示す。

以上





第4図

